



# 核小体因子NucleosteminのマウスES細胞における機能解析

著者	片野 幸
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7357号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00126060">http://hdl.handle.net/2241/00126060</a>

氏名（本籍）	片野 幸
学位の種類	博 士（生物工学）
学位記番号	博 甲 第 7357 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	核小体因子NucleosteminのマウスES細胞における機能解析

主査	筑波大学准教授	博士（薬学）	木村 圭志
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学教授	博士（農学）	谷本 啓司

## 論 文 の 要 旨

Nucleostemin (NS) は主に核小体に局在するタンパク質であり、幹細胞とガン細胞に高く発現する。胚性幹細胞 (ES 細胞) でも発現が見られているが、その機能の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。著者の所属研究室では、NS の ES 細胞での機能を明らかとするため、Tet-off の系を用いて NS のコンディショナルノックアウト (cKO) を可能にした NS Tet-off mouse ES 細胞を樹立し、NS が ES 細胞の生存維持に必要であることを見出した。著者の学位論文では、NS の ES 細胞に於ける機能について報告している。

ES 細胞において NS をノックアウトすると、未分化性維持に関わる様々な転写因子の発現量が減少し、反対に一部の分化マーカーが著しく増加した。ES 細胞はその未分化性維持に LIF-JAK-STAT3、LIF-Grb2-MAPK、LIF-PI3-AKT や Wnt の各シグナルが大きく関与しているため、NS をノックアウトした際のそれぞれのシグナル因子のリン酸化フォームのタンパク質量の変動を調べた。その結果、リン酸化 STAT3 が大きく減少していることが明らかとなった。

次に、未分化性を喪失するという NS ノックアウトの表現型を打ち消す因子を見つけることで、NS の機能について新たな知見を得られると想定し、発現量が減少する未分化因子やシグナル因子についてその強制発現株を作製した。その細胞株で NS をノックアウトしたところ、未分化因子である Nanog と Esrrb のみが完全に NS ノックアウトの表現型を打ち消し、継代維持が可能であった。また、恒常的活性化 STAT3 や Akt の発現株、及び MAPK 阻害剤と GSK3 阻害剤 (Wnt シグナルの活性化) でも、表現型の部分的な打ち消し効果が見られた。強制発現細胞株が NS ノックアウトの表現型を回避しているかについては、未分化な細胞特異的に染色するアルカリフォスファターゼ染色、また、マイクロアレイ解析を行い、Nanog や Esrrb によって著しく遺伝子変動が抑えられていることを確認した。次に、NS が Rad51 のリクルートを介して DNA 修復に関与しているという結果が、神経幹・前駆体細胞、肝細胞、MEF を用いた実験で示されているので、マウス ES 細胞でも NS にこの機能が存在するか検討した。しかし、DNA 修復に必要な Rad51、また野生型 NS と同様に DNA 修復へ寄与する核質局在型 NS を過剰発現させても、NS ノックアウトによる未分化性の喪失を回避できなかった。このことから、DNA 修復とは別に ES 細胞特異的な機能があると考えられる。一方、マウス ES 細胞野生株に NS、核質局在型 NS を過剰発現させると  $\gamma$ -H2AX の foci 状の染色像が少なくなったことから、NS には ES 細胞にお

いても DNA 修復を促進する機能を有すると考えられる。

更に、ES細胞よりも分化状態の進んだEpiblast Stem Cell (EpiSC) でも、NSが細胞の生存に必要であるのか否か、検討した。まず、NS Tet-off mESCに蛍光マーカーであるKusabira Orangeを発現させた安定株を樹立し、そのES細胞を桑実胚にマイクロインジェクションし仮親にもどし、胎生6.5日まで発生を進めさたうえで、Kusabira Orangeが発現している胚性外胚葉のみを取り出し培養をしてEpiSCを単離した。樹立したNS Tet-off EpiSCについて、Dox添加によりNSをノックアウトすると、ES細胞と同じく激しい細胞死、EpiSCの未分化マーカーであるOct3/4の減少が観察できた。このことから、NSはEpiSCにおいてもその未分化性維持や細胞生存に必要なことが明らかとなった。しかし、ES細胞とは異なり、NanogやEsrrbを強制発現させることによる、表現型の打ち消しは見られなかった。これは、ES細胞とEpiSCでは、発現する未分化因子やコファクターに違いがあるためと考えている。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、ESの生存維持に必須な核小体タンパク質であるNSが、ES細胞においてどのように機能しているかを詳細に解析している。著者は、NSが、未分化性維持に関わる種々の転写因子の発現に機能すること、反対に一部の分化マーカーの発現を抑制することを見出した。さらに、未分化因子であるNanogとEsrrbの強制発現がNSノックアウトの表現型を打消し、継代維持を可能とした。また、NanogとEsrrbの強制発現は、NSノックアウトで著しく変動する遺伝子発現を抑制する。また、NSがES細胞より分化状態の進んだEpiSCでも、未分化性維持や細胞生存に必須であるが、NSのノックアウトの表現型はNanogとEsrrbでは打ち消せない。

本研究は、核小体に存在する因子による、未分化性維持の分子機構を詳細に解析し、個々の因子にまで踏み込んで機能を解析した点が評価できる。また、本研究は、現在注目を集めている発生・再生分野での新たな知見を示すもので、再生医療への応用も期待できる。

平成 27年 1月 20日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。